

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際公開番号



WO 9603497A1

(51) 国際特許分類6

C12N 9/26

A1

(43) 国際公開日

1996年2月8日(08.02.96)

(21) 国際出願番号

PCT/JP95/01452

(22) 国際出願日

1995年7月21日(21.07.95)

(30) 優先権データ

特願平6/171206

1994年7月22日(22.07.94)

JP

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

生化学工業株式会社(SEIKAGAKU CORPORATION)[JP/JP]

〒103 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号 Tokyo, (JP)

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)

山形達也(YAMAGATA, Tatsuya)[JP/JP]

山形貞子(YAMAGATA, Sadako)[JP/JP]

〒225 神奈川県横浜市青葉区市ケ尾町337-5 Kanagawa, (JP)

三浦りゅう(MIURA, Ryu)[JP/JP]

〒229 神奈川県相模原市西大沼一丁目23番10号

コスモハイツ2-R Kanagawa, (JP)

(74) 代理人

弁理士 萩野 平, 外(HAGINO, Taira et al.)

〒107 東京都港区赤坂一丁目12番32号

アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo, (JP)

(81) 指定国

CA, US, 欧州特許(AT, DE, FR, GB, IT, SE).

添付公開書類

国際調査報告書

(54) Title : NOVEL HYALURONIDASE

(54) 発明の名称 新規ヒアルロニダーゼ



(57) Abstract

A novel hyaluronidase (HAase) isolated from a supernatant of a human uterine body cancer tissue culture by means of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using hyaluronic acid, modified chondroitin sulfate or the like as the substrate. The obtained HAase hydrolyzes hyaluronic acid at a pH of 3.5 to 7.5, but not chondroitin sulfate, and is useful for, for example, searching remedies for cerebral edema, myocardial infarct and the like, drug additives, and hyaluronidase inhibitors.

(57) 要約

ヒト子宮体癌組織の培養上清から、ヒアルロン酸、修飾-コンドロイチン硫酸等を基質とするドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等を用いて、新規ヒアルロニダーゼ (H A a s e) を分離した。本発明の H A a s e は、p H 3. 5 ~ p H 7. 5 の範囲においてヒアルロン酸を分解し、コンドロイチン硫酸を分解しない。本発明の H A a s e は、脳水腫、心筋梗塞等の医薬品、薬物添加剤、およびヒアルロニダーゼ阻害剤の探索等に有用である。

情報としての用途のみ

P C T に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に P C T 加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DE	ドイツ	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	EE	エストニア	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	ES	スペイン	LT	リトアニア	SD	スーダン
BB	ババルバドス	FI	フィンランド	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BE	ベルギー	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SI	スロベニア
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SK	スロバキア共和国
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BY	ベラルーシ	GU	グアタマラ	MA	マラケシュ	SS	スワジランド
CA	カナダ	HE	ハンガリー	ME	モンテネグロ	TD	チャド
CC	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
CF	コンゴ	IS	アイスランド	ML	マリ	TH	タイ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CH	スイス	JP	日本	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CI	コートジボワール	KE	ケニア	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	US	米国
		LI	リヒテンシュタイン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
				PL	ポーランド	VN	ベトナム

明 細 書

新 規 ヒ ア ル ロ ニ ダ ー ゼ

技 術 分 野

本発明は、新規なヒアルロニダーゼに関し、詳細には医薬品、医薬部外品、またはこれらのスクリーニング等のために有用な新規ヒアルロニダーゼに関する。

背 景 技 術

ヒアルロニダーゼ（以下、「H A a s e」と略記する）は、ヒアルロン酸を低分子化する酵素に与えられた総称で、（１）ヒアルロン酸・コンドロイチン・コンドロイチン硫酸の β -N-アセチル-D-ヘキソサミニド結合を加水分解するエンドヘキソサミニダーゼ型酵素（E C 3. 2. 1. 35）、（２）ヒアルロン酸の β -D-グルクロニド結合を加水分解するエンドグルクロニダーゼ型酵素（E C 3. 2. 1. 36）、（３）ヒアルロン酸の β -N-アセチル-D-グルコサミニド結合を脱離的に分解するエンドグルコサミン開裂型酵素（E C 4. 2. 2. 1）、（４）ヒアルロン酸・コンドロイチン・コンドロイチン硫酸の β -N-アセチル-D-ヘキソサミニド結合を脱離的に分解するエンドヘキソサミン開裂型の酵素等の異なる型のものが知られている。これらはそれぞれ反応の最終産物も異なっているが、いずれもムコ多糖の構造研究や、同定・定量の試薬として広く利用されてきた。

一方、H A a s e は、脳水腫、心筋梗塞等の急性期の処置に医薬品として使用され、また皮下投与用もしくは胸膜滲出の局所療法用の薬剤の添加剤としても用いられてきた。

さらにH A a s e は、H A a s e の活性を阻害する作用を有する物質の探索上においても有用である。ヒアルロン酸は、人体の細胞間隙に水分を保持し、また組織内にゼリー状のマトリックスを形成して細胞を保持したり、皮膚の潤滑性と柔軟性を保ち、機械的障害による外力や細菌の感染を防止する働きがある。ところが、H A a s e はかかるヒアルロン酸を分解する活性を有する。従ってヒアル

ロン酸を分解するH A a s eの活性を抑制する物質は、皮膚の肌荒れ、小ジワ、かさつきなどを防ぎ、しっとり感を保つ薬剤、化粧品となり得る可能性がある。

このようにH A a s eには様々な利用法が提案されているが、その全ての機能が解明されたわけではなく、またさらに新しいH A a s eの出現も待ち望まれていた。

発 明 の 開 示

本発明者らは、新規H A a s eを見出すべく探索を進めてきた結果、ヒト子宮体癌組織の培養上清に新規なH A a s eが産生されることを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明の要旨は、下記の理化学的性質を有するヒト子宮体癌組織由来のヒアルロニダーゼに存する。

基質特異性：

p H 3. 5～7. 5の範囲においてヒアルロン酸を分解し、p H 3. 5～

7. 5の範囲においてコンドロイチン硫酸を分解しない

至適p H：

p H 5. 0付近

等電点：

8. 8

また、本発明のヒアルロニダーゼは、ヒアルロン酸を基質とするドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S - P A G E）において測定した分子量が約94キロダルトンであることが確認された。

以下、本発明につき詳細に説明する。

本発明の新規H A a s eは、ヒト子宮体癌の組織から、目的とするH A a s eの物理的、化学的性質を利用した各種の処理操作に従い分離・精製することができる。すなわち、通常の蛋白沈殿剤による処理、塩析、限外ろ過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲルろ過）、遠心分離、電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、透析法、これらの組合わせ等の処理操作が挙げられる。具体

的には、ヒト子宮体癌組織の培養上清から、ヒアルロン酸、下記参考例記載の修飾-コンドロイチン硫酸等を基質とするゲル電気泳動を用いてマルクスヴーグンテンフェーネル(Markusw Guntenhöner) 他、マトリクス 第12巻, 第388~396頁(1992年) [Matrix Vol. 12, 388~396 (1992)] の方法に従って分離することができる。

ゲル電気泳動用担体の合成は、従来のポリアクリルアミドゲルを調製する方法 {ラエムリ(Laemmli), 英国(U. K.), ネイチャー, 第227巻, 第680-685頁(1970年) [Nature, 227, 680-685 (1970)]} に準じて行うことができる。即ち、アクリルアミドとN, N'-メチレンビスアクリルアミドを含む水溶液にヒアルロン酸又は修飾-コンドロイチン硫酸を加えて、例えば冷暗所に一昼夜置くなどして均一に混合し、これを重合開始剤、例えば過硫酸塩、過酸化ベンゾイル等の過酸化物、アゾビスイソブチロニトリル等のアゾ化合物や酸化剤と還元剤よりなるレドックス開始剤を用いて重合する。また、重合促進剤として、N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンを添加してもよい。アクリルアミドに対するN, N'-メチレンビスアクリルアミドの使用量は、一般のポリアクリルアミドゲルに使用されている程度であり、ヒアルロン酸又は修飾-コンドロイチン硫酸の使用量は、通常1~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲から選ばれる。また、重合反応は、所望の大きさの担体に適したセル中で行う。

このようにして調製したヒアルロン酸混合又は修飾-コンドロイチン硫酸結合ポリアクリルアミドゲルを担体として使用し、ヒト子宮体癌組織の培養上清を該培養上清中に含まれる酵素が基質を分解しない条件で電気泳動する。次いで、泳動後の担体を必要に応じて緩衝液等で洗浄した後、通常のアッセイ条件下に置き、酵素反応後の担体を、アルシアンブルーやトルイジンブルー等の発色試薬で発色させる。培養上清中に含まれる酵素がポリアクリルアミドゲルに固定した基質を分解すると、分解された部分のみが発色せず白く抜けて検出されるので、これにより該酵素の活性及び分子量を同定することができる。かくして得られた酵素が本発明のH A a s eである。また、酵素反応時のp Hを種々変化させてH A a s e活性を測定することによって、本発明酵素の至適p Hを確認することができる。

る。

なお、上記手法及び本発明のH A a s eの性質に関して、本出願の優先権主張
日後の1995年3月1日に発行された発明者自らの論文、アナリティカル バ
イオケミストリ、第225巻、第333-340頁(A n a l y t i c a l B
5 i o c h e m i s t r y, 225, 333-340)に記載されている。

図面の簡単な説明

図1は、修飾-コンドロイチン硫酸の合成経路を示す図面である。

図2は、(a)本発明のH A a s eを、ヒアルロン酸を基質とするS D S - P
10 A G Eにて検出した結果を示す図面である。図中、レーン1、2、3、4は、そ
れぞれp H 3. 5、5. 0、6. 0、7. 5における電気泳動パターンを表す。
(b)本発明のH A a s eを、修飾-コンドロイチン硫酸を基質とするS D S -
P A G Eにて検出した結果を示す図面である。図中、レーン1、2、3、4は、
それぞれp H 3. 5、5. 0、6. 0、7. 5における電気泳動パターンを表す。

15

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明につき具体的な実施例を挙げて説明するが、その要旨を越えない
限り以下に限定されるものではない。

参考例

20 サメ軟骨由来のコンドロイチン硫酸(Ⅰ)(分子量40,000~48,000; 4-硫酸: 6-硫酸=1:5)の還元末端を、アール. エイチ. ラージャー
ら他(R. H. R a j a e t a l.) アナル. バイオケム., 第139巻
, 第168-177頁(1984年)[A n a l. B i o c h e m., 139,
168-177(1984)]の方法に従ってNaBH₄で還元し、NaIO₄
25 で部分酸化し、エチレンジアミンを用いてアミノ化して反応物を得た。反応物は
4℃の透析で精製した。精製した還元末端アミノ化コンドロイチン硫酸(Ⅳ) 1
00mgを2mlの蒸留水に溶かし、1mlのエタノールを加えた。混合物は、
40℃で2時間、アリルグリシジルエーテル1mlとインキュベートし、4℃で
蒸留水に対して透析を行った後、凍結乾燥した。こうして修飾-コンドロイチン

硫酸（V）を得た。以上の合成経路を図1に示す。

実施例 1

1 mm厚の8%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）-ポリアクリルアミドゲルを調製した。このゲルの作成時に、4℃で一昼夜保存したヒアルロン酸（鶏冠由来、分子量824,000）1 mg/mlを、最終濃度が17 μg/mlとなるように加えた。

一方、ヒト子宮体癌組織の培養上清（名古屋大学の玉腰浩司博士より分譲）15 μlにSDSおよびラエムリ（Laemmli）緩衝液〔ネイチャー、第227巻、第680-685頁（1970年）〔Nature, 227, 680-685（1970）〕を加え、上記ゲルに供した。

電気泳動は、室温で行った。泳動後、ゲルは室温で1時間、2.5%トリトン（Triton）X-100で洗浄した。ゲルは新鮮なバッファー（50 mM グルコン酸-Na₂HPO₄および0.15 M NaCl（pH 5.0, 6.0, 7.5）、あるいは0.1 M HCOOH-HCOONaおよび0.15 M NaCl（pH 3.5））を用いて、37℃、16時間インキュベートした後、37℃で2時間、0.1 mg/ml プロナーゼ溶液〔20 mM Tris-HCl（pH 8.0）；プロナーゼはストレプトマイセス グライセウス（*Streptomyces griseus*）由来のもので、キャルバイオケム コープ（Calbiochem Corp）社より購入〕で処理した。インキュベートしたゲルは、20%エタノール-10%酢酸で20分間洗浄し、0.5%アルシアンブルー（Alcian blue）を含む20%エタノール-10%酢酸で1時間染色した後、20%エタノール-10%酢酸で洗浄した。

結果を図2（a）に示す。pH 3.5～7.5の範囲内において、94キロダルトン付近に明瞭なバンドが観測された。そして同バンドは、特にpH 5.0付近において高いヒアルロン酸分解活性を有することも確認された。

実施例 2

実施例1において、ヒアルロン酸の代わりに参考例で調製した修飾-コンドロイチン硫酸を用い、ゲル中の最終濃度が8.5 μg/mlとなるように加えたこと以外は同様にして、ヒト子宮体癌組織の培養上清の電気泳動を行った。

結果を図 2 (b) に示す。pH 3.5～7.5 の範囲内においては、特に特徴的なバンドは何ら認められなかった。

以上の結果から、94 キロダルトンのタンパクはヒアルロン酸に対して作用し、コンドロイチン硫酸に対しては全く作用しない、ヒアルロニダーゼ活性を有していることが判明した。

実施例 3

以下の条件による 2 次元電気泳動にて、94 キロダルトンタンパク質の等電点を求めた。

1 次元目：

10	上部ゲル (1 mm 厚の 3 % アクリルアミドゲル)	
	30 % アクリルアミド - 0.8 % ビスアクリルアミド	0.2 ml
	40 % グリセリン	0.25 ml
	蒸留水	1.53 ml
	ペルオキソ二硫酸アンモニウム (過硫酸アンモニウム)	
15	(100 mg/ml)	20 μ l
	N, N, N', N' - テトラメチルエチレンジアミン	1.25 μ l
	等電点電気泳動ゲル (1 mm 厚の 6 % アクリルアミドゲル)	
	30 % アクリルアミド - 0.8 % ビスアクリルアミド	2.0 ml
	40 % グリセリン	2.0 ml
20	蒸留水	5.5 ml
	アンフォライン (LKB 社), pH 3.5～10	0.5 ml
	ペルオキソ二硫酸アンモニウム (過硫酸アンモニウム)	
	(100 mg/ml)	40 μ l
	N, N, N', N' - テトラメチルエチレンジアミン	7.0 μ l
25	ランニングバッファー	
	カソード溶液: 20 mM NaOH	
	アノード溶液: 10 mM H ₃ PO ₄	
	サンプルバッファー	
	等電点電気泳動ゲル溶液:	

30%アクリルアミド-0.8%ビスアクリルアミド	2.0 ml
40%グリセリン	2.0 ml
蒸留水	5.5 ml
アンフォライン (LKB社), pH 3.5~10	0.5 ml

5 に、さらに40%グリセリンを等量加えたもの
サンプル

子宮体癌組織培養上清	10 μ l
マーカー (BIO-RAD社)	5 μ l

泳動条件

10 400 V、2時間30分、0℃

2次元目:

分離ゲル (0.17 mg/ml ヒアルロン酸含有、1 mm厚の3%アクリルアミドゲル)

30%アクリルアミド-0.8%ビスアクリルアミド	2.24 ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.3)-0.4% SDS	2.10 ml
1 mg/ml ヒアルロン酸水溶液	1.44 ml
蒸留水	2.59 ml

ペルオキソ二硫酸アンモニウム (過硫酸アンモニウム)

(100 mg/ml)	84 μ l
N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン	2.10 μ l

ランニングバッファー

0.025M Tris	
0.192M グリシン (pH 8.3)-0.1% SDS	

25 サンプルバッファー

ラエムリ (Laemmli) 緩衝液

サンプル

等電点電気泳動上の子宮体癌組織培養上清

泳動条件

20 mA、1時間40分

洗浄

2.5%トリトン (T r i t o n) X-100で1時間

インキュベーション

5 37℃で16時間 (pH 5.0)

プロテアーゼ処理

0.1 mg/ml プロナーゼ (キャルバイオケム コーポ (C a l b i o c h e m C o r p) 社) で、37℃、2時間

固定

10 20%エタノール-10%酢酸で20分間

染色

20%エタノール-10%酢酸に溶かした0.5%アルシアンブルー (A l c i a n b l u e) で1時間

脱色

15 20%エタノール-10%酢酸で1時間を2回

この結果、本発明のH A a s eの等電点は、8.8であることが確認された。

産業上の利用可能性

20 本発明のH A a s eは新規な酵素であり、従来のH A a s eと同様、脳水腫、心筋梗塞等に対する医薬品として、薬物の添加剤として、またH A a s eの活性を阻害する物質の探索上有用である。

25

請求の範囲

1. 下記の理化学的性質を有するヒト子宮体癌組織由来のヒアルロニダーゼ。

基質特異性：

5 pH 3.5～7.5の範囲においてヒアルロン酸を分解し、pH 3.5～7.

5の範囲においてコンドロイチン硫酸を分解しない

至適pH：

pH 5.0付近

等電点：

10 8.8

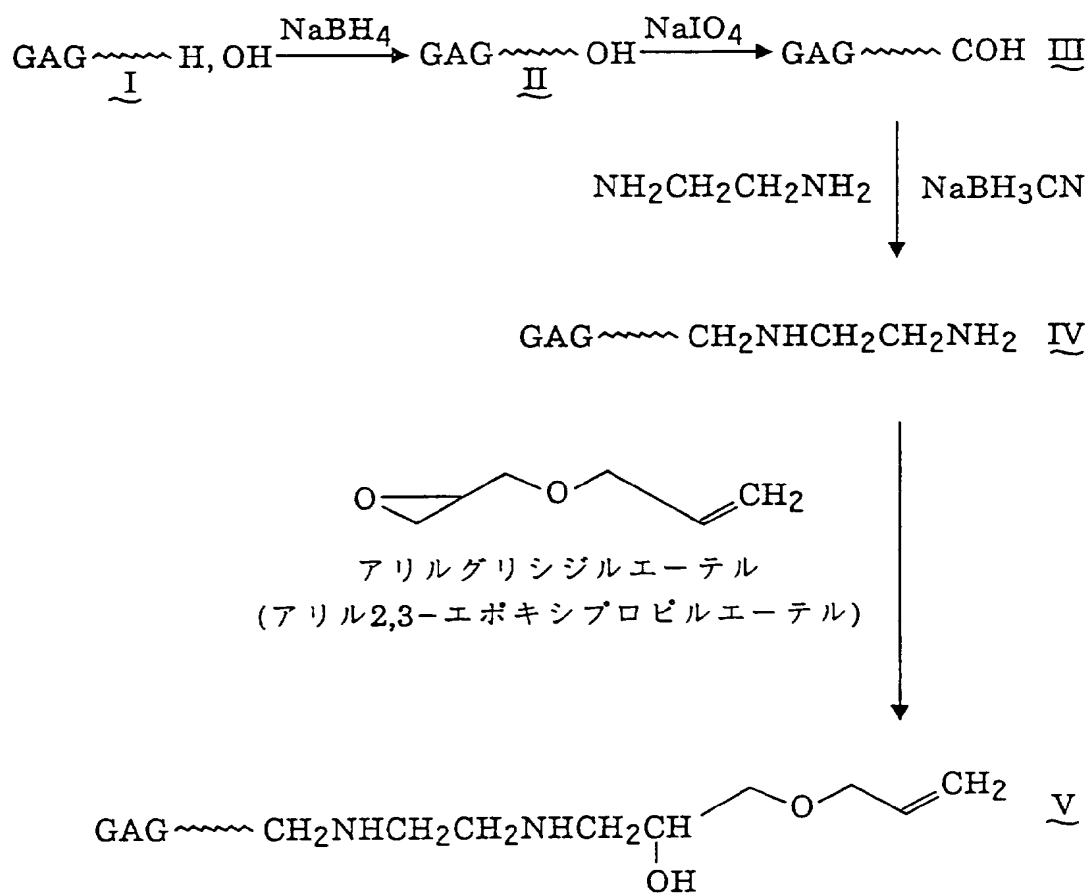
2. ヒアルロン酸を基質とするドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において測定した分子量が約94キログルトンであることを特徴とする請求の範囲第1項記載のヒアルロニダーゼ。

15

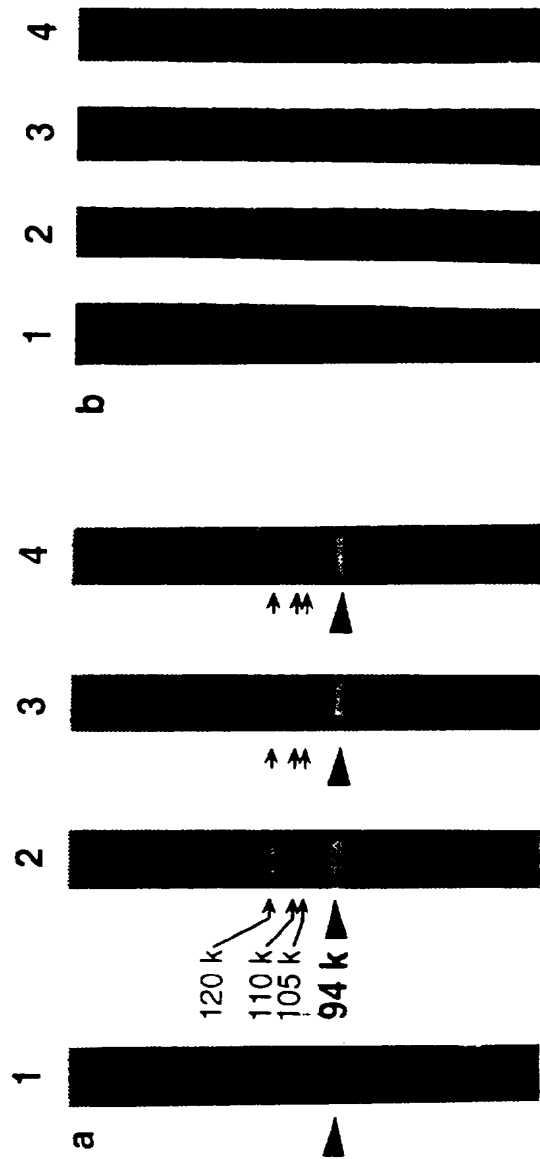
20

25

図 1



2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N9/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N9/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P	Analytical Biochemistry, Vol. 225, No. 2, (1995), p. 333-340	1 - 2
A	Infection and Immunity, Vol. 47, No. 2, (1985), p. 508-513	1 - 2
A	Developmental Biology, Vol. 106, No. 2, (1984), p. 351-359	1 - 2
A	Developmental Biology, Vol. 66, No. 2, (1978), p. 308-320	1 - 2



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

October 3, 1995 (03. 10. 95)

Date of mailing of the international search report

October 24, 1995 (24. 10. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N9/26		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N9/26		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P	Analytical Biochemistry, 第225巻, 第2号, (1995), p.333-340	1-2
A	Infection and Immunity, 第47巻, 第2号, (1985), p.508-513	1-2
A	Developmental Biology, 第106巻, 第2号, (1984), p.351-359	1-2
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日
03.10.95		24.10.95
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 村 上 騎 見 高 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Developmental Biology, 第66巻, 第2号, (1978), p.308-320	1-2